

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/76633 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 47/00**

[DE/DE]; Fliederweg 26, 42799 Leichlingen (DE). **DEN-
NIG, Jörg** [DE/DE]; Richrather Str. 173, 40723 Hilden
(DE). **ERBACHER, Christoph** [DE/DE]; Hülsberg 8,
42781 Haan (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/03746**

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. April 2001 (03.04.2001)

(74) **Anwalt: WACHENFELD, Joachim**; Vossius & Partner,
Siebertstr. 4, 81675 München (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) **Bestimmungsstaat (national):** US.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) **Angaben zur Priorität:**
100 16 881.7 5. April 2000 (05.04.2000) **DE**

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Max-Volmer-Str.
4, 40724 Hilden (DE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): WEBER, Martin**

(54) **Title:** TARGETED TRANSFECTION OF CELLS USING A BIOTINYLATED DENDRIMER

(54) **Bezeichnung:** GEZIELTE TRANSFEKTION VON ZELLEN MITTELS BIOTINYLIERTEM DENDRIMER

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for carrying out the targeted transfection of cells, to compositions, which can be used for such methods, and to corresponding medicaments for use in gene therapy. The invention particularly relates to a method for introducing nucleic acid into cells involving the following steps: (a) mixing a nucleic acid with a dendrimer, whereby a portion of the dendrimer molecules is biotinylated; mixing the prepared complex, which consists of a nucleic acid and a dendrimer, with a second complex, which consists of an avidin or a streptavidin and of a biotinylated target-specific binding molecule, and; (c) incubating the complex prepared in step (b) with cells. Dendrimers that are well-suited for the invention are, for example, partially solvolyzed polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. Target-specific binding molecules are, in particular, cell type-specific markers also of the cell surface of the target cells.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten Transfektion von Zellen, Zusammensetzungen, die für solche Verfahren verwendet werden können, sowie entsprechende Arzneimittel für die Gentherapie. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen mit den Schritten: (a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist; (b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten zielspezifischen Bindungsmolekül; und (c) Inkubation des in Schritt (b) entstandenen Komplexes mit Zellen. Für die vorliegende Erfindung gut geeignete Dendrimere sind beispielsweise partiell solvolysierte Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere. Zielspezifische Bindungsmoleküle sind insbesondere zellspezifische Marker auch der Zelloberfläche der Zielzellen.

WO 01/76633 A2

BEST AVAILABLE COPY

Gezielte Transfektion von Zellen mittels biotinyliertem Dendrimer

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten Transfektion von Zellen sowie Zusammensetzungen, die für solche Verfahren verwendet werden können.

5

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, genetisches Material in Zellen einzubringen. Zur Transfektion *in vivo* werden im wesentlichen zwei Methoden angewendet, Virus-vermittelter Gentransfer und die Transfektion mittels kationischer Liposomen. Als virale Vektoren werden Adenoviren und Re-

10 troviren benutzt, die in der Lage sind, nichtvirale DNA in mitotisch aktive Zellen zu transfizieren. Die kationischen Liposomen interagieren mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA. Der resultierende Komplex wird zu den Zellen gegeben und von den Zellen endocytiert. Zur Transfektion *in vitro* stehen zusätzliche Methoden zur Verfügung, zum Beispiel Calcium-Phosphat-Präzipitation,

15 DEAE(Diethylaminoethyl)-Dextran-Transfektion, und Elektroporation. Bei der Calcium-Phosphat-Methode wird DNA mit CaCl_2 in einem Phosphat-Puffer gemischt. Der entstehende Calcium-Phosphat-Komplex bindet an die Zellmembran und wird endocytiert. Das positiv geladene DEAE-Dextran interagiert mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA. Der DEAE-Dextran-DNA-Komplex bindet an

20 die Zelloberfläche und wird endocytiert. Bei der Elektroporation werden Zellen mit DNA gemischt. Für einen kurzen Moment wird eine hohe Spannung angelegt. In der Zellmembran entstehen Poren, durch die die DNA aufgenommen wird.

Die genannten Verfahren sind mit verschiedenen Nachteilen verbunden. So ermöglichen virale Vektoren zwar die effiziente Transfektion von Zellen auch *in vivo*. Ihr biologisches Gefahrenpotential ist aber sehr hoch. Die Effizienz beim Einsatz kationischer Liposomen *in vivo* ist sehr niedrig. Außerdem ermöglichen beide *in vivo*-Verfahren keine gezielte Transfektion von einzelnen Zelltypen im Gewebeverband. Bei den *in vitro*-Anwendungen besteht insbesondere das Problem, daß

25 Suspensionszelllinien (insbesondere T- und B-Zelllinien) mit den chemischen Transfektionsreagenzien und -Methoden nur sehr schwer transfiziert werden können. Im Gegensatz zu adhärenenten Zellen, bei denen oft Effizienzen von über 50 % transfizierten Zellen erreicht werden können, liegen die Effizienzen bei Suspensionszellen im allgemeinen bei 0 % bis 5 % transfizierten Zellen. Bei der Elektropo-

30

ration sind die Transfektionseffizienzen in Suspensionszellen im allgemeinen ähnlich niedrig. Die Methode bietet aber oft die Möglichkeit, solche Zelllinien zu transfizieren, die sich durch andere Methoden überhaupt nicht transfizieren lassen. Bei dieser Methode sterben jedoch durch die Transfektion 50 % bis 70 % der Zellen.

5 Ebenso ist die Menge an DNA und Zellen pro Ansatz, die für diese Transfektionsmethode benötigt werden, deutlich höher als für andere Methoden. Retrovirale Vektoren ermöglichen zwar die effiziente Transfektion von Suspensionszellen. Die Methode ist aber sehr kompliziert und aufwendig. Vor allem besitzen retrovirale Vektoren ein hohes biologisches Gefahrenpotential.

10

Dendrimere sind dreidimensionale Polymere, die aus reiterativen Sequenzen um einen Kern herum aufgebaut und in verschiedenen Molekulargewichten und Größen herstellbar sind (Tomalia et al., Angew Chem Int Ed 1990, 29:138). Aus der WO 95/02397 ist die Komplexbildung von Dendrimeren mit Nukleinsäuren und die
15 Verwendung von Dendrimeren zur Transfektion von Zellen bekannt. Tang et al., Bioconjugate Chem 1996, 7:703-714 beschreiben die Aktivierung von Polyamidoamin-Dendrimeren durch thermische Degradation zur Verbesserung der Transfektionseffizienz. Die Verwendung von Dendrimeren allein als Transfektionsreagenzien ist aber ebenfalls mit den oben beschriebenen Nachteilen behaftet.

20

Schoeman et al., J Drug Target 1995, 2(6):509-516 beschreiben ein System zum gezielten Transfer von DNA in Zellen, bei dem biotinyliertes Polylysin verwendet wird, das über Streptavidin an biotinyliertes Transferrin gebunden wird.

25

Wilbur et al., Bioconjug Chem 1998, 9(6):813-825 beschreiben Biodistributionsexperimente mit biotinylierten Starburst-Dendrimeren.

30

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung verbesserter Transfektionsverfahren und der dafür erforderlichen Mittel, die es insbesondere gestatten, Nukleinsäuren auch in schwer transfizierbare Zellen wie Suspensionszellen einzuführen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen mit den Schritten

- (a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist;
- (b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit
5 einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten zielspezifischen Bindungsmolekül;
- (c) Inkubation des in Schritt (b) entstandenen Komplexes mit Zellen.

Die Nukleinsäure, für die synonym auch der Begriff Polynukleotid verwendet werden kann, kann eine Ribonukleinsäure (RNA), Deoxyribonukleinsäure (DNA), oder
10 auch gemischte Form sein. Im allgemeinen Fall kann es sich um jeden Typ von Polynukleotid handeln, der ein N-Glykosid oder C-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidinbase oder einer modifizierten Purin- oder Pyrimidinbase darstellt, also auch solche Basen enthalten kann, die in der Natur nicht vorkommen. Außer der Base
15 selbst kann auch der Zuckerrest modifiziert sein. Eingeschlossen sind Nukleinsäuren mit modifizierter Verknüpfung der Untereinheiten, etwa Phosphorothioat- oder -amidat-Verknüpfungen. Die Nukleinsäure kann einzel-, doppel- oder mehrsträngig, linear oder zirkulär sein. Sie kann einem in einer Zelle vorkommenden Molekül entsprechen wie etwa genomische DNA oder Boten-RNA (mRNA), oder in vi-
20 tro erzeugt werden wie Komplementär-DNA (cDNA), Gegenstrang-RNA (aRNA), oder synthetische Nukleinsäuren. Die Nukleinsäure kann aus wenigen Untereinheiten, mindestens zwei Untereinheiten, bevorzugt acht oder mehr Untereinheiten bestehen wie etwa Oligonukleotide, mehreren hundert Untereinheiten bis hin zu mehreren tausend Untereinheiten wie etwa bestimmte Expressionsvektoren. Be-
25 vorzugt enthält die Nukleinsäure die kodierende Information für ein Polypeptid in funktionellem Zusammenhang mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression des Polypeptids in der Zelle erlauben, in die die Nukleinsäure eingebracht wird. So ist die Nukleinsäure in einer bevorzugten Ausführungsform ein Expressionsvektor. In einer anderen Ausführungsform ist sie ein Gegenstrang (antisense)-
30 Oligonukleotid, das beispielsweise durch Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure in der Zelle, in die dieses Gegenstrang-Oligonukleotid eingebracht wird, die Expression eines bestimmten Gens unterdrücken kann. Der erfindungsgemäße Komplex kann auch Gemische verschiedener Nukleinsäuren enthalten.

Dendrimer im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein verzweigtes Polymer, das eine dreidimensionale, hochgeordnete Verbindung darstellt, wobei verzweigte oligomere/polymere Sequenzen um ein Kermolekül herum durch reiterative Reaktionssequenzen aufgebaut werden können, und das durch geeignete funktionale Endgruppen unter bestimmten Bedingungen eine positiv geladene äußere Oberfläche aufweist (polykationisches Dendrimer). Solche Dendrimere und ihre Herstellung werden beschrieben in WO 84/02705, US 4,507,466, US 4,558,120, US 4,568,737, 4,587,329, US 4,631,337, US 4,694,064, US 4,713,975, US 4,737,550, US 4,871,779, 4,857,599, EP 0 234 408, EP 0 247 629, EP 0 271 180, und insbesondere Tang et al., supra, WO 95/02397, und Tomalia et al., supra.

Geeignete Kermoleküle weisen mindestens zwei reaktive Gruppen auf, über die die oligomeren/polymere Sequenzen mit dem Kern verknüpft werden können, oder sie sind zur Einführung solcher reaktiven Gruppen geeignet. Beispiele für solche reaktiven Gruppen sind Hydroxyl-, Ether-, Amino-, Imino-, Amido-, Imido-, Ammonium-, Halogen-, Carboxyl-, Carboxyhalid-, Sulfhydrylgruppen etc. Bevorzugte Kermoleküle sind Ammoniak, Tris-(2-aminoethyl)amin (TAEA), Lysin, Ornithin, Pentaerythritol, und Ethylendiamin (EDA).

Um diese Kermoleküle können die verzweigten oligomeren/polymere Sequenzen durch stufenweise Addition von Monomeren aufgebaut werden. Jeder Reaktionszyklus, der neue Verzweigungspunkte erzeugt, generiert dadurch eine höhere „Generation“ des Dendrimers. Bevorzugt sind dabei pharmazeutisch gut verträgliche Sequenzen wie zum Beispiel Polyamidoamine, herstellbar durch die Reaktion eines Alkylesters einer α,β -ethylenisch ungesättigten Carbonsäure oder eines α,β -ethylenisch ungesättigten Amides mit einem Alkylen-Polyamin oder einem Polyalkylen-Polyamin.

Die terminalen Gruppen der oligomeren/polymere Sequenzen, die die äußere Oberfläche des Dendrimers bilden, sollen die Eigenschaft haben, daß sie unter geeigneten Bedingungen positive Ladungen akquirieren können, zum Beispiel in wäßriger Lösung bei physiologischen pH-Werten. Beispiele für solche Gruppen sind primäre, sekundäre, tertiäre und quaternäre aliphatische oder aromatische Amine, Guanidiniumgruppen, oder Azole, die auch mit S oder O substituiert sein

können, oder Kombinationen davon. Die terminalen kationischen Gruppen können zu einem Anteil von 10 bis 100% aller terminalen Gruppen vorhanden sein, bevorzugt 50 bis 100%. Das Dendrimer kann auch nicht-kationische terminale Gruppen in einem Anteil von 0 bis 90% aufweisen, z.B. Hydroxyl-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfhydryl-, Amid- oder Thioethergruppen.

Für die vorliegende Erfindung gut geeignete Dendrimere sind beispielsweise Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere, die um Ammoniak, Tris-(2-aminoethyl)amin (TAEA) oder Ethylendiamin (EDA) als Kernmoleküle durch stufenweise Addition der beiden Monomere Methacrylat und Ethylendiamin aufgebaut werden können (Tang et al., supra). Die terminalen Gruppen eines solchen Dendrimers sind bevorzugt primäre Aminogruppen. Bevorzugt sind dabei PAMAM-Dendrimere der 5., 6. oder 7. Generation, insbesondere der 6. Generation gemäß Tang et al., supra. Die theoretischen Molekulargewichte, Zahl der terminalen Amine und hydrodynamischen Radien solcher PAMAM-Dendrimere können der Publikation Tang et al., supra, entnommen werden.

Die Dendrimere sind bevorzugt nicht völlig intakte oder hochsymmetrische Moleküle gemäß ihrer Idealstruktur, sondern weisen in einem gewissen Ausmaß strukturelle Defekte, Fehlstellen oder Abweichungen von der Idealstruktur auf. Es hat sich gezeigt, daß solche strukturellen Defekte die Brauchbarkeit von Dendrimern als Transfektionsreagenzien signifikant erhöhen können (Tang et al., supra). Solche Defekte können beispielsweise durch partielle solvolytische Degradation des Dendrimers erzeugt werden. Geeignete Lösungsmittel dafür sind beispielsweise Wasser, 1-Butanol, 2-Butanol, oder 2-Ethoxyethanol. Die Solvolyse kann durch Hitze beschleunigt werden. So führt beispielsweise Kochen in Wasser für 5 bis 15 Stunden, bevorzugt 7 bis 12 Stunden, bei einem TAEA-PAMAM-Dendrimer der 6. Generation (6-TAEA-PAMAM) zu einer deutlichen Erhöhung der Transfektionseffizienz. Für ein 5-TAEA-PAMAM liegt der bevorzugte Bereich bei 5 bis 12 Stunden, für ein 6-EDA-PAMAM bei 10 bis 15 Stunden. Die optimalen Refluxzeiten in anderen Lösungsmitteln können entsprechend variieren, z.B. in wasserfreiem 1-Butanol 20 bis 60 Stunden für 6-TAEA-PAMAM, bevorzugt 30 bis 50 Stunden, besonders bevorzugt 40-50 Stunden. Alternativ zur solvolytischen Degradation können die genannten strukturellen Defekte auch bereits bei der Syn-

these erzeugt werden, beispielsweise durch anteilige Zugabe von Monomeren bei jedem Zyklus, die keine Verzweigungspunkte generieren können oder keine Kettenverlängerung zulassen, z.B. *N,N'*-Dimethylacrylamid. Dendrimere mit strukturellen Defekten, Fehlstellen oder Abweichungen von der Idealstruktur in dem genannten Sinne, insbesondere solche, die durch partielle Solvolyse erzeugt werden können, sollen hier als aktivierte Dendrimere bezeichnet werden. Es wird angenommen, daß die bessere Brauchbarkeit von aktivierten Dendrimeren als Transfektionsreagenzien mit ihrer größeren sterischen Flexibilität zusammenhängt.

Ein aktiviertes Dendrimer, das sich sehr gut für die vorliegende Erfindung eignet, ist in dem Produkt SuperFect® der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, enthalten.

Der Anteil der biotinylierten Dendrimermoleküle an der Gesamtmenge der Dendrimermoleküle im Komplex kann 0,01 bis 100 % (Mol/Mol) betragen, bevorzugt 0.5 bis 50 % (Mol/Mol), besonders bevorzugt 5 bis 20 % (Mol/Mol), ganz besonders bevorzugt 10 bis 15 % (Mol/Mol). Vorteilhaft kann ein vorgefertigtes Gemisch aus biotinyliertem und nicht-biotinyliertem Dendrimer zur Bildung des erfindungsgemäßen Komplexes mit der Nukleinsäure umgesetzt werden, doch können die drei Komponenten auch in anderer Reihenfolge oder gleichzeitig vermischt werden. Ein solches Gemisch aus biotinyliertem und nicht-biotinyliertem Dendrimer kann hergestellt werden, indem biotinyliertes und nicht-biotinyliertes Dendrimer beispielsweise in Massenverhältnissen von 1:1 bis 1:256, bevorzugt 1: 2 bis 1:128, besonders bevorzugt 1:4 bis 1:24, ganz besonders bevorzugt 1:6 bis 1:10 vermischt werden. Die Vermischung kann zweckmäßig durch Vermischen wäßriger Lösungen der Komponenten erfolgen.

Unter biotinyliertem Dendrimer soll hierbei eine Dendrimerzusammensetzung verstanden werden, in der mindestens 80%, bevorzugt mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95%, ganz besonders bevorzugt mindestens 98% oder 99% der Dendrimermoleküle mit einem oder mehreren Biotinmolekülen verknüpft sind.

Biotin (Merck Index No. 1272, 12th Ed., Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA) und Methoden zur Biotinylierung, d.h. zur Verknüpfung von Biotin oder Biotinderivaten mit anderen Substanzen, meist unter Verwendung eines aktivierten Biotins oder Biotinderivats, sind aus dem Stand der Technik bekannt (Bayer et al.,
5 Anal Biochemistry 1985, 149: 529-536; Bengtstrom et al., Nucleosides and Nucleotides 1990, 9: 123; Pantano and Kuhr, Anal Chem 1993, 65: 623-630; Bayer and Wilchek, Method of Biochemical Analysis 1980, 26: 1-45; Hofmann et al., Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues. Biochemistry 1982, 21: 978-984; Leary et al., Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80: 4045-4049; Costello
10 et al., Clin Chem 1979, 25: 1572-1580; Spiegel and Wilchek, J Immunol 1981, 127: 572-575; Rosenberg et al., J Neurochem 1986, 46: 641-648).

Unter aktiviertem Biotin oder aktiviertem Biotinderivat sollen hier Verbindungen verstanden werden, die sich vom Biotin ableiten, und die durch Einführung einer
15 reaktiven Gruppe, insbesondere einer Abgangsgruppe an einer Carboxyfunktion der Seitenkette des Biotins für Biotinylierungsreaktionen geeignet sind. In den Begriff des Biotinderivats sind insbesondere eingeschlossen modifizierte Formen des Biotins, in denen beispielsweise die Seitenkette des Biotins verlängert wurde, so daß daraus eine Abstandshalterfunktion (Spacer) resultiert. Dabei können auch
20 andere funktionelle Gruppen eingeführt werden, die eine kovalente Verknüpfung des Biotins mit Dendrimeren, Proteinen, oder anderen Substanzen erlauben. Ein solches Derivat ist beispielsweise 6-(Biotinamido)hexansäure (Biotinamidocaprinsäure) und deren aktivierte Derivate, wie z.B. Biotinamidocaprinsäure-*N*-hydroxy-succinimidester.

25
Der Grad der Biotinylierung der biotinylierten Dendrimermoleküle, d.h. die Zahl der Biotinmoleküle, die mit einem Dendrimermolekül verknüpft ist, beträgt vorzugsweise 1 oder mehr. Bevorzugt ist biotinyliertes Dendrimer, das durch Umsetzung von Dendrimer mit einem ein- bis 64fachen molaren Überschuß an Biotin hergestellt wurde, besonders bevorzugt mit einem 2- bis 16fachen, besser noch 2- bis
30 12fachen Überschuß, beispielsweise einem 3- bis 5fachen, insbesondere einem 4fachen Überschuß an Biotin. Für die Biotinylierung von Dendrimeren können an sich bekannte Standardverfahren angewendet werden, zum Beispiel die Umsetzung von Dendrimer mit *N*-(+)-Biotinyl-6-Aminocaprinsäure-*N*-Succinimidylester,

einem aktivierten Biotinderivat, das zusätzlich ein Hexansäuregerüst als Abstandshalter (Spacer) enthält (Hermanson G T, Bioconjugate Techniques, Academic Press, London, Großbritannien, 1996, Seiten 575-580).

- 5 Geeignete Mischungsverhältnisse für Nukleinsäure zu Dendrimer sind von 10:1 (Gew/Gew) bis 1:50 (Gew/Gew), bevorzugt 1:2 bis 1:20, für Suspensionszellen beispielsweise bevorzugt von 1:2 bis 1:10 (Gew/Gew), ganz besonders bevorzugt etwa 1:3. Der Fachmann kann durch Routineexperimente für das jeweilige Transfektionsproblem optimierte Mischungsverhältnisse ermitteln.

10

Die Mischung von Nukleinsäure und Dendrimer erfolgt unter Bedingungen, unter denen es zu der Ausbildung eines Komplexes zwischen Nukleinsäure und Dendrimer kommt. Dem Fachmann sind solche Bedingungen bekannt. Zweckmäßig kann diese Mischung durch Vereinigung wäßriger Lösungen der Komponenten
15 ausgeführt werden, wobei eine oder beide dieser Lösungen auch gepuffert sein und ggf. weitere Zusätze enthalten können.

20

Durch Vermischen der Nukleinsäure und des partiell biotinylierten Dendrimers (d.h. beispielsweise einem Gemisch von biotinyliertem Dendrimer und nicht-biotinyliertem Dendrimer in den oben angegebenen Mengenverhältnissen) unter
geeigneten Bedingungen entsteht ein Komplex, in dem die Komponenten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander assoziiert sind.

25

In einem solchen Komplex können gegebenenfalls Dendrimer und Nukleinsäure auch durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft werden.

30

Erfindungsgemäß kann der so entstandene Komplex aus Nukleinsäure und partiell biotinyliertem Dendrimer unter geeigneten Bedingungen mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten Ziel-spezifischen Bindungsmolekül gemischt und auf diese Weise ein größerer Komplex hergestellt werden, in dem das Nukleinsäure-Dendrimer-Addukt über das Avidin-Biotin-System mit einem zielspezifischen Bindungsmolekül verknüpft wird. Ein solcher Komplex erlaubt seine zielgerichtete Bindung an die Oberfläche von Zellen, die einen Bindungspartner oder Rezeptor des Bindungsmoleküls tragen,

und damit das zielspezifische Einbringen der gewünschten Nukleinsäure in solche Zellen. Diese Mischung der beiden Komplexe kann zweckmäßig erfolgen, indem geeignete wäßrige Lösungen der beiden Komplexe vereinigt werden, wobei eine oder beide dieser Lösungen gepuffert sein und gegebenenfalls weitere Zusätze
5 enthalten kann.

Avidin ist ein aus dem Stand der Technik bekanntes Glycoprotein, das mit hoher Affinität biotinylierte Substanzen binden kann (Merck Index No. 920, 12th Ed., Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA); Fuccillo, Application of the avidin-
10 biotin technique in microbiology, BioTechniques 1985, 3: 494; Methods Enzymol Eds. M. Wilchek, E.A. Bayer 1990, 184: 1-671). Es kann beispielsweise aus Hühnereiweiß isoliert werden, hat dann ein Molekulargewicht von etwa 66000 und ist kommerziell erhältlich. Alternativ kann auch Streptavidin, ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 60000 aus Streptomyces avidinii verwendet werden
15 (Fuccillo, Application of the avidin-biotin technique in microbiology, BioTechniques 1985, 3: 494; Haeuptle et al., Protein isolated from the bacterium Streptomyces avidinii, having a high affinity for biotin, J Biol Chem 1983, 258: 305; Avidin-Biotin technology: Methods Enzymol Eds., M. Wilchek, E.A. Bayer 1990, 184: 1-671).

20 Zielspezifische Bindungsmoleküle, die spezifisch an bestimmte Bindungspartner binden, sind im Stand der Technik in großer Zahl bekannt. Im Sinne der vorliegenden Erfindung sind solche Bindungsmoleküle bevorzugt, die an Bindungspartner oder Rezeptoren binden, die auf der Oberfläche von Zellen exponiert sind, insbesondere solchen Bindungspartnern oder Rezeptoren, die spezifisch von bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Weiterhin sind solche zielspezifischen Bindungsmoleküle bevorzugt, die nach Bindung an ihren Bindungspartner oder Re-
25 zeptor auf der Zelloberfläche in das Zellinnere internalisiert werden, beispielsweise durch Rezeptor-vermittelte Endozytose.

30 Ein solches zielspezifisches Bindungsmolekül ist zum Beispiel das Protein Transferrin, dessen spezifischer Bindungspartner, der Transferrin-Rezeptor, von einer Reihe von Zelltypen, beispielsweise der B-Zelllinie K562 (ATCC CCL-243) exprimiert wird. Transferrin ist ein Eisen transportierendes Protein, das nach der Bindung an seinen Rezeptor aktiv endozytiert wird. Wird Transferrin über das Avidin-

Biotin-System an einen Nukleinsäure-Dendrimer-Komplex konjugiert, können mit einem solchen Komplex Zellen gezielt transfiziert werden, die den Transferrinrezeptor exprimieren. Ein anderes Beispiel für ein solches zielspezifisches Bindungsmolekül ist ein Antikörper, der spezifisch für das T-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD3 ist. Bindet ein solcher Antikörper an CD3, wird der entstandene Komplex aktiv in die Zelle internalisiert. Bei der Verwendung eines CD3-spezifischen Antikörpers als zielspezifisches Bindungsmolekül für die vorliegende Erfindung lassen sich selektiv T-Zellen transfizieren. Eine T-Zelllinie, die CD3 exprimiert, ist die Zelllinie Jurkat (DSMZ ACC 282). Analog können für die vorliegende Erfindung auch Antikörper als zielspezifische Bindungsmoleküle verwendet werden, die für andere Bindungspartner oder Rezeptoren spezifisch sind, insbesondere für Zelltyp-spezifische Zelloberflächenmarker, die nach Bindung eines Liganden internalisiert werden. Als Antikörper können außer Immunglobulinen, die Tetramere oder Multimere aus kompletten schweren und leichten Ketten darstellen, auch abgeleitete Antikörpermoleküle verwendet werden, die im Stand der Technik bekannt sind, z.B. Fragmente von Immunglobulinen, die die Antigenbindungsdomäne enthalten (z.B. F_{ab}-Fragmente) oder rekombinante Proteine, die Antigenbindungsdomänen (insbesondere die sogenannten variablen Regionen) von Immunglobulinen ggf. in modifizierter Form enthalten, z.B. humanisierte Antikörper oder einkettige Antikörpermoleküle (scFv). Der Begriff „Antikörper“ soll hier alle solchen Moleküle einschließen, die spezifisch an einen Bindungspartner binden und wenigstens eine Aminosäuresequenz enthalten, die homolog zu der variablen Region einer Immunglobulinkette ist.

Ein weiteres Beispiel für ein zielspezifisches Bindungsmolekül ist ein Antikörper gegen CD62E (ELAM-1, E-Selectin), z.B. der monoklonale Antikörper, der von der Hybridoma-Zelllinie H18/7 (ATCC HB-11684) produziert wird. CD62E ist ein Oberflächenmarker für aktivierte vaskuläre Epithelzellen, die eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen spielen, und ein klinisches Target für die Gentherapie auf diesem Indikationsgebiet (Harari et al., Gene Ther 1999, 6(5):801-7).

Das zielspezifische Bindungsmolekül kann nach an sich bekannten Methoden biotinyliert werden, zum Beispiel mit Biotinamidocaprinsäure-*N*-hydroxysuccinimidester in wäßriger Hydrogencarbonatlösung (pH 8.5) (Hofmann,

K., et al., Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues. Biochemistry, 21, 978-984 (1982)). Bei der Verwendung dieses Biotinderivats wird durch das Capronsäuregerüst gleichzeitig ein Abstandshalter (Spacer) zwischen das Bindungsmolekül und das Biotin eingeführt, um eine optimale Wechselwirkung
5 zwischen Biotin und Avidin oder Streptavidin zu gewährleisten. Ist das zielspezifische Bindungsmolekül ein Protein, zum Beispiel Transferrin oder ein Antikörper, hat sich ein Biotinylierungsgrad von 1 bis 15 Biotinmolekülen pro Bindungsproteinmolekül als zweckmäßig erwiesen, bevorzugt 5 bis 13 Biotinmoleküle, besonders bevorzugt 8 bis 12 Biotinmoleküle pro Proteinmolekül. Der Biotinylierungs-
10 grad kann durch die Wahl eines geeigneten molaren Mengenverhältnisses der Reaktanden der Biotinylierungsreaktion gesteuert werden.

Der Komplex aus biotinyliertem zielspezifischem Bindungsprotein und Avidin oder Streptavidin kann durch Mischung der beiden Komponenten unter geeigneten Be-
15 dingungen erfolgen. Solche Bedingungen sind dem Fachmann bekannt. Zweckmäßig kann die Mischung durch Vereinigung wäßriger Lösungen der Komponenten erfolgen, wobei eine oder beide dieser Lösungen gepuffert sein und gegebenenfalls weitere Zusätze enthalten kann.

20 Als Mengenverhältnis von Nukleinsäure/Dendrimer-Komplex zu Avidin oder Streptavidin hat sich 1:1 bis 100:1 (Gew/Gew) als zweckmäßig erwiesen, ganz besonders bevorzugt jedoch 1.5:1 bis 4:1 (Gew/Gew), insbesondere 2:1 bis 4:1. Für das Mengenverhältnis Nukleinsäure/Dendrimer-Komplex zu zielspezifischem Bindungsmolekül hat sich 1:1 bis 40:1 (Gew/Gew) als zweckmäßig erwiesen, be-
25 sonders vorteilhaft 2:1 bis 10:1 (Gew/Gew). Sehr gute Ergebnisse konnten beispielsweise mit Mengenverhältnissen von 1:3:2:1 (Nukleinsäure: Dendrimer: Avidin: Bindungsprotein; Gew/Gew/Gew/Gew) erzielt werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Einhaltung einer bestimmten Reihenfolge der Verfahrensschritte wichtig. Es hat sich gezeigt, daß die vorteilhaften
30 Wirkungen des Verfahrens insbesondere dann zum Tragen kommen, wenn sowohl der Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer als auch der Komplex aus Avidin oder Streptavidin und zielspezifischem Bindungsmolekül vorgefertigt werden, bevor beide Komplexe dann zusammengegeben werden.

Der dabei erhaltene Komplex, der die Komponenten Nukleinsäure, Dendrimer, und zielspezifisches Bindungsmolekül in operativer Weise vereinigt, kann zum Einbringen der Nukleinsäure in Zellen verwendet werden. Zu diesem Zweck wird
5 dieser Komplex, im folgenden auch Transfektionskomplex genannt, mit Zellen inkubiert, d.h. unter geeigneten Bedingungen in Kontakt mit Zellen gebracht.

So können Zellen oder Gewebe in vitro mit dem Transfektionskomplex in einem geeigneten Milieu inkubiert werden. Sollen Kulturzellen transfiziert werden, kann
10 der Transfektionskomplex zum Kulturmedium gegeben werden. Zur Transfektion in vivo kann der Transfektionskomplex in einen tierischen oder pflanzlichen Organismus einschließlich des Menschen appliziert werden. Die Applikation kann dabei systemisch oder topisch erfolgen, bei tierischen Organismen insbesondere parenteral, z.B. durch intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, intra- oder sub-
15 kutane Injektion, intravenöse Infusion, pulmonare, buccale, nasale, dermale oder transdermale Applikation. Auch andere Applikationswege, z.B. orale/enterale Applikation sind unter geeigneten Bedingungen und mit entsprechenden Formulierungen möglich. Der Transfektionskomplex kann auch lokal direkt in ein Zielgewebe, etwa ein Organ oder ein Tumor, appliziert werden. Zur Applikation in vivo sollte
20 der Transfektionskomplex in pharmazeutisch verträglicher Form vorliegen. Er kann dafür mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger kombiniert werden. Die Formulierung richtet sich dabei nach dem Applikationsmodus. Zur Injektion oder Infusion kann der Transfektionskomplex beispielsweise in isotonischer Kochsalzlösung oder in einem isotonischen Puffer wie PBS (phosphate buffered saline)
25 oder Ringer's Lösung vorliegen, zur pulmonaren Verabreichung zum Beispiel in Form eines pharmazeutisch verträglichen Aerosols. Auch feste Formulierungen können je nach Verwendungszweck gewählt werden, beispielsweise gefriergetrocknete Präparate, die vor Verabreichung mit Wasser rekonstituiert werden können. Dem Fachmann sind geeignete pharmazeutische Träger und Formulierungen
30 bekannt, zum Beispiel aus Gennaro (Hrsg.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., 1995, Mack Publishing Co., Easton, PA, USA. Auf diese Weise kann der Transfektionskomplex bei Verwendung einer entsprechenden Nukleinsäure als Arzneimittel in der Gentherapie eingesetzt werden.

Die Dosierung wählt der Fachmann in Abhängigkeit von der Art der Erkrankung, dem Zustand des Patienten, dem therapeutischen Ansatz sowie weiteren Faktoren. Im allgemeinen wird bei humaner Anwendung die Menge der verabreichten DNA im Bereich von 0.1 µg bis 100 mg/kg Körpergewicht liegen, vorzugsweise 2.5
5 µg bis 10 mg/kg Körpergewicht.

Eine gentherapeutische Anwendung ist beispielsweise die selektive Transfektion aktivierter vaskulärer Endothelzellen, die eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielen. Durch Einbringen und Expression von geeigneten Genen in die-
10 sen Zellen kann die inflammatorische Antwort moduliert werden (Harari et al., supra). Ein zielspezifisches Bindungsmolekül, das für diese Anwendung geeignet ist, ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Zelloberflächenantigen CD62E (E-Selectin, ELAM-1), z.B. der monoklonale Antikörper, der von der Hybridoma-Zelllinie H18/7 (ATCC HB-11684) produziert wird. Eine geeignete Nukleinsäure
15 wäre beispielsweise ein Expressionsvektor, der das Gen für das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin Interleukin-10 (IL-10) exprimieren kann (Henke et al., J Immunol 2000, 164(4):2131-41). Für eine solche Anwendung ist die intravenöse Injektion des Transfektionskomplexes bevorzugt.

20 Ein anderes klinisches Anwendungsgebiet ist die Gentherapie von Krebserkrankungen. Tumorzellen können mit der vorliegenden Erfindung selektiv transfiziert werden, indem zielspezifische Bindungsmoleküle verwendet werden, die selektiv an spezifische Oberflächenantigene von Tumorzellen binden, zum Beispiel Antikörper gegen CD44v6, das ein Marker für Plattenepithelkarzinome ist (Heider et
25 al., Cancer Immunol Immunother 1996, 43(4):245-53), oder MART-1 (Ribas et al., Cancer Gene Ther 1999, 6:523-36), das ein Markerprotein für Melanome ist. Beispiele für geeignete Nukleinsäuren für solche Anwendungen sind Expressionsvektoren, die die Gene für die Apoptose auslösenden Proteine E2F-1 (Dong et al., Cancer 1999, 86:2021-33) oder Apoptin (Pietersen et al., Gene Ther 1999, 6:882-
30 92) exprimieren können.

Protokolle für die Transfektion von Zellen in vivo durch Applikation von Nukleinsäure/Dendrimer-Komplexen in tierische Organismen sind im Stand der Technik bekannt (Turunen et al., Gene Ther 1999, 6(1):6-11; Maruyama-Tabata et al., Ge-

ne Ther 2000, 7(1):53-60; Harada et al., Gene Ther 2000, 7(1):27-36). Die Auswahl von Applikationsart und Dosierung hängt von der Art der Erkrankung, dem Körpergewicht des Patienten usw. ab und liegt im Können des Durchschnittsfachmanns.

5

Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren für Zellen, die in Zellkultur in Suspension wachsen (Suspensionszellen), also nicht an Substratoberflächen adhärent wachsen. Insbesondere ist das Verfahren geeignet für Blutzellen oder Blutzelllinien, zum Beispiel B- oder T-Zellen oder davon abgeleitete Zelllinien.

10

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und verzweigtem kationischen Polymer, wobei das verzweigte kationische Polymer die Eigenschaft hat, mit Nukleinsäuren Komplexe zu bilden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Anteil des verzweigten kationischen Polymers biotinyliert ist. Bevorzugt ist ein solches kationisches Polymer ein Dendrimer wie vorstehend beschrieben.

15

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer, dadurch gekennzeichnet, daß ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist. Bevorzugt beträgt dabei der Anteil der Dendrimermoleküle, die biotinyliert sind, an der Gesamtmenge der Dendrimermoleküle 0,01 bis 100 % (Mol/Mol), besonders bevorzugt 0,5 bis 50 % (Mol/Mol), besonders bevorzugt 5 bis 20 % (Mol/Mol), besonders bevorzugt 10 bis 15 % (Mol/Mol).

25

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer, dadurch gekennzeichnet, daß ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, herstellbar durch Mischung von biotinyliertem Dendrimer mit nicht-biotinyliertem Dendrimer in einem Verhältnis von von 1:1 bis 1:256 (Gew/Gew), bevorzugt 1: 2 bis 1:128 (Gew/Gew), besonders bevorzugt 1:4 bis 1:24 (Gew/Gew), ganz besonders bevorzugt 1:6 bis 1:10 (Gew/Gew).

30

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, herstellbar durch ein Verfahren mit den Schritten

- (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge eines aktivierten Biotins oder Biotinderivats oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin oder aktiviertem Biotinderivat, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin oder Biotinderivat kommt;
- (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24;
- (c) Inkubation der unter (b) entstandenen Mischung mit Nukleinsäure unter Bedingungen, unter denen sich ein Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer bilden kann.

In einem weiteren Aspekt enthält eine solche Zusammensetzung einen Komplex wie in einem der vorangehenden Absätze definiert, der zusätzlich Avidin oder Streptavidin sowie ein biotinyliertes Ziel-spezifisches Bindungsmolekül enthält. Ein solches zielspezifische Bindungsmolekül bindet vorzugsweise spezifisch an ein Zelloberflächenmolekül, beispielsweise Transferrin oder ein Antikörper.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Reagenzienkit zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen, mindestens enthaltend

- (a) Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist; und
- (b) Avidin oder Streptavidin.

Ein solcher Kit enthält die Komponenten in einer gemeinsamen Verpackungseinheit, gegebenenfalls mit zusätzlichen Komponenten und/oder Hilfsmitteln wie Pufferlösungen o.ä. sowie gegebenenfalls mit einer Arbeitsanleitung und/oder Produktinformation auf Papier, Kunststoffolie oder elektronischem Datenträger. Ein solcher Reagenzienkit kann vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden. Bevorzugt enthält ein solcher Reagenzienkit als zusätzliche Komponente mindestens ein biotinyliertes zielspezifisches Bindungsmolekül und/oder

mindestens eine Nukleinsäure. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines solchen Reagenzienkits zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen, insbesondere Suspensionszellen wie T- und B-Zellen.

- 5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, mit den Schritten
- (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge eines aktivierten Biotins oder Biotinderivates oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin
10 oder Biotinderivat, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin oder Biotinderivat kommt;
- (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-
15 biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24;
- (c) Inkubation der unter (b) entstandenen Mischung mit Nukleinsäure unter Bedingungen, unter denen sich ein Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer bilden kann.

20

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Zusammensetzung, enthaltend Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, herstellbar nach einem Verfahren mit den Schritten

- (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge aktivierten Biotins
25 oder Biotinderivats oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin oder Biotinderivat, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin kommt;
- (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-
30 biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle

biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, sowie gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei
5 ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, sowie gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure, Dendrimer, Avidin oder
10 Streptavidin, und einem zielspezifischen Bindungsmolekül, wobei das zielspezifische Bindungsmolekül sowie ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, sowie gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

15 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Dendrimers, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, in der Gentherapie.

20 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, in der Gentherapie.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Komplexes aus Nukleinsäure, Dendrimer, Avidin oder Streptavidin, und einem zielspezifischen Bindungsmolekül, wobei das zielspezifische Bindungsmolekül sowie ein
25 Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, in der Gentherapie.

30 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Dendrimers, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Gentherapie.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Gentherapie.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Komplexes aus Nukleinsäure, Dendrimer, Avidin oder Streptavidin, und einem zielspezifischen Bindungsmolekül, wobei das zielspezifische Bindungsmolekül sowie ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung eines Arzneimittels für die Gentherapie.

10

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Dendrimers, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, wie vorstehend beschrieben, in einem Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen in vivo mit den Schritten

15

(a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist;

(b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten Ziel-spezifischen Bindungsmolekül;

20

(c) Verabreichung des in Schritt (b) entstandenen Komplexes in einen pflanzlichen oder tierischen Organismus, gegebenenfalls in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

25

Abbildungen

Abbildung 1: Grundprinzip des Avidin-Biotin-Systems.

5 **Abbildung 2:** Einfluß des Biotinylierungsgrades des Transferrins auf die Transfektionseffizienz. Biotinylierungsgrad 1:10 (Transferrin/Biotin). Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge biotinylierten Transferrins pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 1.

10

Abbildung 3: Einfluß des Biotinylierungsgrades des Transferrins auf die Transfektionseffizienz. Biotinylierungsgrad 1:5 (Transferrin/Biotin). Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge biotinylierten Transferrins pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 1.

15

Abbildung 4: Einfluß des Biotinylierungsgrades des Transferrins auf die Transfektionseffizienz. Biotinylierungsgrad 1:1 (Transferrin/Biotin). Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge biotinylierten Transferrins pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 1.

20

Abbildung 5: Transfektionseffizienz bei unterschiedlicher Reihenfolge der Komplexbildung. Verfahrensschritte: (a) Avidin + biotinyliertes Transferrin; 10 Minuten Inkubation; (b) SuperFect (SF)/ biotinyliertes SF + DNA; 5 Minuten Inkubation; (c) Mischen der beiden Komplexe; 20 Minuten Inkubation. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge Transferrin pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 2.

25

Abbildung 6: Transfektionseffizienz bei unterschiedlicher Reihenfolge der Komplexbildung. Verfahrensschritte: (a) SF/ biotinyli. SF + DNA; 5 Minuten Inkubation; (b) Zugabe von Avidin; 10 Minuten Inkubation; (c) Zugabe von biotinyli. Transferrin;

30

20 Minuten Inkubation. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge Transferrin pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 2.

- 5 **Abbildung 7:** Transfektionseffizienz bei unterschiedlicher Reihenfolge der Komplexbildung. Verfahrensschritte: (a) Biotinyl. SF + Avidin; 10 Minuten Inkubation; (b) Zugabe von SuperFect; Mischen; (c) Zugabe der DNA; 5 Minuten Inkubation; (d) Zugabe von biotinyl. Transferrin; 30 Minuten Inkubation. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge Transferrin pro Well an.
- 10 Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 2.

- Abbildung 8:** Transfektionseffizienz bei direkter Kopplung von Avidin an SuperFect. $\frac{1}{4}$ Beimischung Avidin-SF-Kopplungsprodukt zur Gesamtmenge an Superfect. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge an biotinyltem Transferrin pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 3.
- 15

- Abbildung 9:** Transfektionseffizienz bei direkter Kopplung von Avidin an SuperFect. $\frac{1}{32}$ Beimischung Avidin-SF-Kopplungsprodukt zur Gesamtmenge an Superfect. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge an biotinyltem Transferrin pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 3.
- 20

- Abbildung 10:** Transfektionseffizienz bei direkter Kopplung von Avidin an SuperFect. $\frac{1}{128}$ Beimischung Avidin-SF-Kopplungsprodukt zur Gesamtmenge an Superfect. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge an biotinyltem Transferrin pro Well an. Die Ordinatenwerte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 3.
- 25

30

Abbildung 11: Transfektionseffizienz der Transfektion von Jurkat-Zellen mit biotinyltem Anti-CD3-Antikörper. Die Abszissenwerte geben die im Transfektionsexperiment eingesetzte Menge an biotinyltem Antikörper an. Die Ordinaten-

werte geben die β -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Transfektionseffizienz an. Siehe Beispiel 4.

5

Beispiele

Beispiel 1: Gezielte Transfektion von K562-Zellen mit biotinyliertem Transferrin/ unterschiedliche Biotinylierungsstufen des Transferrins

10

Biotinylierungsreaktionen

Humanes Holo-Transferrin wurde von Calbiochem (La Jolla, CA, USA) bezogen, und in PBS gelöst. Die Biotinylierung erfolgte mit D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Biotin-7-NHS) mittels eines kommerziell erhältlichen Biotin Protein Labeling Kits (Roche Molecular Biochemicals, Hoffman-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gemäß Herstellerangaben. Der Biotinylierungsgrad wurde mittels HABA (4' Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure)-Farbstoffreaktion (Fluka, Milwaukee, WI, USA) und Standard-Proteinbestimmung gemessen (Hermanson, supra, Seiten 591-592).

20

Die Biotinylierung von Dendrimer (SuperFect[®], Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), einem aktivierten TAEA-PAMAM der 6. Generation, erfolgte mit N-(+)-Biotinyl-6-aminocaprinsäure-N-succinimidylester gemäß Hermanson, supra, Seiten 575 bis 580. Dabei wurden jeweils 4 mg Superfect mit dem entsprechenden molaren Überschuß an Biotin (4-, 8-, 16- oder 32fach) umgesetzt. Anschließend erfolgte eine Dialyse.

25

Kultivierung der Suspensionszellen:

30

Die Zelllinie K562 (ATCC CCL-243) wurde zunächst drei Tage in Spinner-Flaschen in RPMI-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Zelldichte zu Beginn betrug $1,5 \times 10^5$ bis 2×10^5 Zellen pro ml. Nach drei Tagen wurde die Kultur auf eine Dichte von ca.

3×10^5 Zellen pro ml verdünnt. Nach weiteren 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen in 96-Well-Platten à 30 000 K562-Zellen pro Well in 100 µl ausgesät. Erfolgte am darauffolgenden Tag nochmals eine Transfektion, so wurde die Spinner-Kultur zuvor auf eine Dichte von ca. 3×10^5 Zellen pro ml verdünnt.

5

Transfektion:

1. Pro Fünffachansatz (der anschließend für vier Wells einer 96-Well-Platte benutzt wurde) wurden 10 µl einer Transferrinlösung (verdünnt in Medium ohne Serum) mit 10 µl einer Avidinlösung (Fluka, Milwaukee, WI, USA; verdünnt in Medium ohne Serum) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden umgerechnet 1 µg Avidin und 25 ng bis 1 µg biotinyliertes Transferrin pro Well eingesetzt.
- 15 2. Zur Komplexbildung wurden 150 µl DNA (pCMVβ, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA; ein Expressionsplasmid für β-Galaktosidase)-Lösung mit 100 µl Reagenzlösung (SuperFect-Reagenz; Mischung aus biotinyliertem und nicht-biotinyliertem SuperFect im Verhältnis 1:8 ; das biotinylierte SuperFect wurde mit einem 4fachen molaren Überschuß an Biotinreagenz hergestellt) für
20 fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die eingesetzten Mengen entsprachen dabei 0,5 µg DNA und 1,5 µg Transfektionsreagenz pro Well.
3. Die Komplexe aus (1) und (2) wurden miteinander gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 25 4. Je 50 µl der Komplexe aus (3) wurden pro Well zu den Zellen zugegeben und mit der Zellsuspension gemischt und 48 h inkubiert.
5. Vor der Lysis der Zellen wurden diese in Mikrotiterplatten mit konischen Böden
30 überführt. In diesen Mikrotiterplatten können die Zellen durch Zentrifugieren für fünf Minuten bei 2000 UpM pelletiert werden. Vor Aufnahme in Lysispuffer (5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) und Zurücküberführen in die ursprünglichen Platten wurden die Zellen und die ursprünglichen Wells zweimal mit PBS gewaschen.

6. Im Anschluß erfolgte zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ein β -Galaktosidase-Assay mit ONPG (2-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Substrat bzw. eine X-Gal-*In-Situ*-Färbung (Ausubel et al. (Hrsg.), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New York 1988, 9.5.12).

Entsprechend des Protokolls für die gezielte Transfektion von Suspensionszellen wurden K562-Zellen im 96-Well Maßstab transfiziert. Es wurden Transferrine eingesetzt, für die Biotinylierungsgrade von durchschnittlich ca. 10, 5 oder ein Biotinmolekül pro Transferrinmolekül gemessen worden waren. Bei einem Biotinylierungsgrad von durchschnittlich ca. 10 Biotinen pro Transferrinmolekül kommt es bei einer eingesetzten Menge von 250 ng bis 1000 ng Transferrin pro Well zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz um ca. den Faktor 7,5. Für die Biotinylierungsgrade 1:5 und 1:1 kam es nur zu einer schwachen Erhöhung um das maximal zweifache (siehe Abbildungen 2 bis 4). Ein höherer Biotinylierungsgrad (1:13) zeigte einen geringeren Effekt auf die Transfektionseffizienz. In einem weiteren Experiment wurde für 1:10 biotinyliertes Transferrin mittels X-Gal-*In-Situ*-Färbung der Prozentsatz transfizierter Zellen bestimmt. Während die β -Galaktosidase-Aktivität von 12,2 Units/ml (ohne Transferrin) auf 71,7 Units/ml (500 ng biotinyliertes Transferrin) gesteigert werden konnte, wurde für 500 ng biotinyliertes Transferrin eine Transfektionseffizienz von 28 % transfizierten Zellen ermittelt.

Es wurde ferner der Einfluß des Biotinylierungsgrades des SuperFect auf die Transfektion untersucht. Eingesetzt wurde biotinyliertes SuperFect, bei dem in der Biotinylierungsreaktion ein vier-, acht-, 16- oder 32facher Überschuß an Biotin eingesetzt worden war (im Folgenden als 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 biotinyliert bezeichnet. Pro Well wurden 0,5 μ g DNA (pCMVB β ; ein Expressionsplasmid für β -Galaktosidase) und 1,5 μ g SuperFect-Reagenz zur Transfektion verwendet. Es wurde zwischen der Hälfte (1/2) und 1/128 an biotinyliertem SuperFect zugegeben. Mit zunehmender Menge an biotinyliertem SuperFect nimmt die Transfektionseffizienz ab.

Es wurden außerdem für alle vier unterschiedlich biotinylierten SuperFect-Ansätze Experimente durchgeführt, bei denen steigende Mengen an Avidin zu den SuperFect-biotinylierten SuperFect-DNA-Komplexen zugegeben wurden. Es wurden zwischen 10 ng und 5000 ng Avidin pro Well (einer 96-Well-Platte) in einem Volumen von 10 µl pro Fünffachansatz eingesetzt. Die Inkubation mit Avidin erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Mit steigender Menge an Avidin kommt es zuerst zu einer Zunahme der Transfektionseffizienz, die als β -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden kann. Bei einem Anteil von 1/8 biotinyliertem SuperFect kam es über 1000 ng Avidin pro Well zu einer Abnahme der β -Gal-Aktivität. Für weitere Experimente wurden 1:4 biotinyliertes SuperFect in der Beimischung 1/8 und 1000 ng Avidin pro Well verwendet.

Die Verwendung von biotinyliertem SuperFect in Kombination mit Avidin und biotinyliertem Transferrin (Verhältnis von 10 Molekülen Biotin pro 1 Molekül Transferrin) ermöglicht es, in K562-Zellen die Transfektionseffizienz von 2 bis 5 % bis auf über 25% transfizierte Zellen zu erhöhen.

Beispiel 2: Transfektionseffizienz in Abhängigkeit von der Reihenfolge der Verfahrensschritte bei der Bildung des Transfektionskomplexes

Um abzuklären, ob die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten zu den Komplexen auf die Erhöhung der Transfektionseffizienz Einfluß hat, wurden Transfektionsexperimente in K562-Zellen durchgeführt, bei denen nachfolgende Abläufe eingehalten wurden:

- a.) 1. Avidin + biotinyliertes Transferrin; 10 Minuten Inkubation
2. SuperFect (SF)/ biotinyliertes SF + DNA; 5 Minuten Inkubation
3. Mischen der beiden Komplexe; 20 Minuten Inkubation

- b.) 1. SF/ biotinyli. SF + DNA; 5 Minuten Inkubation
2. Zugabe von Avidin; 10 Minuten Inkubation
3. Zugabe von biotinyli. Transferrin; 20 Minuten Inkubation

- c.) 1. Biotinyl. SF + Avidin; 10 Minuten Inkubation
2. Zugabe von SuperFect; Mischen
3. Zugabe der DNA; 5 Minuten Inkubation
4. Zugabe von biotinyl. Transferrin; 30 Minuten Inkubation

5

Die Transfektionseffizienz für diese drei Varianten ist in den Abbildungen 5, 6 und 7 dargestellt.

Der Effekt einer Verstärkung der Transfektionseffizienz durch das Biotin-Avidin-System tritt nur auf, wenn DNA und SuperFect/ biotinyl. SuperFect sowie Avidin und biotinyl. Transferrin getrennt voneinander komplexiert und erst anschließend beide Komplexe gemischt werden. Bei Vorinkubation des biotinylierten Superfects mit dem Avidin kommt es sogar zu einem massiven Verlust an Transfektionseffizienz, da wahrscheinlich die Ausbildung des SuperFect-DNA-Komplexes verhindert wird.

15

Beispiel 3: Direkte Kopplung von Avidin an SuperFect

Als Alternative zu einem System, bei dem biotinyliertes SuperFect, Avidin und biotinyliertes Transferrin zum Einsatz kommen, wurde in K562-Zellen ein System getestet, das auf eine direkte, chemische Kopplung von Avidin an SuperFect basiert. Die Kopplung wurde gemäß Hermanson, supra, Seiten 575-583 ausgeführt.

Untersucht wurden Avidin-SuperFect-Kopplungsprodukte, bei denen die Kopplung für 2 oder 24 Stunden erfolgte oder ein bidirektionaler Linker (N-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)-Propionat) eingesetzt worden war. In den Abbildung 8, 9 und 10 sind beispielhaft die Ergebnisse für ein Avidin-SuperFect-Kopplungsprodukt von zwei Stunden mit folgendem Ablauf der Inkubationsschritte dargestellt:

30

1. 10 µl einer SuperFect-Avidin-Kopplungsprodukt-Lösung + 10 µl einer Lösung mit biotinyliertem Transferrin (1:10 biotinyliert; die Konzentrationen wurden so gewählt, daß das jeweils gewünschte Endverhältnis (1:4, 1:32,

- 1:128 (Gew/Gew) Transferrin/Kopplungsprodukt) so wie eine Endkonzentration von 1,5 µg SuperFect/Well erreicht wurde); 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur;
2. Zugabe von 90 µl SuperFect-Verdünnung; 10 Minuten Inkubation bei
5 Raumtemperatur;
3. Zugabe von 150 µl DNA-Lösung (pCMVB); 10 Minuten Inkubation bei
Raumtemperatur.

Alle Verdünnungen wurden in Medium ohne Serum hergestellt; pro Well einer 96-
10 Well-Platte wurden 0,5 µg DNA, 1,5 µg SuperFect-Reagenz mit wechselndem Anteil an Avidin-SF-Kopplungsprodukt (siehe Abbildungen) eingesetzt.)

Angegeben sind auf der Abszisse die eingesetzten Mengen an biotinyliertem Transferrin pro Well und in den Titeln der Diagramme der Anteil an Avidin-SF-
15 Kopplungsprodukt an der SuperFect-Gesamtmenge. Das Ergebnis für eine parallel durchgeführte konventionelle SuperFect-Transfektion ergab 10,3 Units/ml.

Abhängig von der eingesetzten Menge an Avidin-SuperFect-Kopplungsprodukt kommt es zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz (1/32- und 1/128-
20 Beimischung). Durch biotinyliertes Transferrin wird aber in keinem Fall eine weitere Erhöhung der Effizienz bewirkt. Dieses Ergebnis wurde auch bei einer geänderten Reihenfolge der Inkubationen (1. Mischen SF mit Avidin-SF-Kopplungsprodukt; 2. Zugabe der DNA; 3. Zugabe des biotinylierten Transferrins) und der Verwendung alternativer Kopplungsprodukte (Kopplung über 24 Stunden;
25 Verwendung eines bidirektionalen Linkers) erhalten.

Beispiel 4: Gezielte Transfektion von Jurkat-Zellen mit biotinyliertem anti CD3-Antikörper

Antikörper

5

Als Antikörper wurde der kommerziell erhältliche biotinylierte α humanCD3 von Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

Kultivierung der Suspensionszellen:

10

Die Zelllinie Jurkat (DSMZ ACC 282) wurde zunächst drei Tage in Spinner-Flaschen in RPMI-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Zelldichte zu Beginn betrug $1,5 \times 10^5$ bis 2×10^5 Zellen pro ml. Nach drei Tagen wurde die Kultur auf eine Dichte von ca. 3×10^5 Zellen pro ml verdünnt. Nach weiteren 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen in 96-Well-Platten à 50 000 Zellen pro Well in 100 μ l ausgesät. Erfolgte am darauffolgenden Tag nochmals eine Transfektion, so wurde die Spinner-Kultur zuvor auf eine Dichte von ca. 3×10^5 Zellen pro ml verdünnt.

15

Transfektion:

20

1. Pro Fünffachansatz (der anschließend für vier Wells einer 96-Well-Platte benutzt wurde) wurden 10 μ l einer Antikörperlösung (verdünnt in Medium ohne Serum) mit 10 μ l einer Avidinlösung (verdünnt in Medium ohne Serum) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden umgerechnet 0,75 μ g Avidin und 25 ng bis 1 μ g biotinylierter Antikörper pro Well eingesetzt.

25

2. Zur Komplexbildung wurden 150 μ l DNA (pCMV β ; ein Expressionsplasmid für β -Galaktosidase)-Lösung mit 100 μ l Reagenzlösung (SuperFect-Reagenz; Mischung aus biotinyliertem und nicht-biotinyliertem SuperFect im Verhältnis 1:8 ; das biotinylierte SuperFect wurde mit einem 4fachen molaren Überschuß an Biotinreagenz hergestellt) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die eingesetzten Mengen entsprachen dabei 0,5 μ g DNA und 1,5 μ g Transfektionsreagenz pro Well.

30

3. Die Komplexe aus (1) und (2) wurden miteinander gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 5 4. Je 50 µl der Komplexe aus (3) wurden pro Well zu den Zellen zugegeben und mit der Zellsuspension gemischt und für 48 h inkubiert.
5. Vor der Lysis der Zellen wurden diese in Mikrotiterplatten mit konischen Böden überführt. In diesen Mikrotiterplatten können die Zellen durch Zentrifugieren für
10 fünf Minuten bei 2000 UpM pelletiert werden. Vor Aufnahme in Lysispuffer und Zurücküberführen in die ursprünglichen Platten wurden die Zellen und die ursprünglichen Wells zweimal mit PBS gewaschen.
6. Im Anschluß erfolgte zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ein β-
15 Galaktosidase-Assay mit ONPG als Substrat bzw. eine X-Gal-*In-Situ* -Färbung .

In dem hier dargestellten Experiment wurde die T-Zelllinie Jurkat mit biotinyliertem anti-CD3-Antikörper transfiziert. Nach Optimierung des Systems wurden 0,75 µg Avidin pro Well und 1:4 biotinyliertes SuperFect in einer Beimischung von 1/8 eingesetzt. Die Menge an biotinyliertem Antikörper ist unter den Balken im Diagramm
20 in Abbildung 11 angegeben. Der Wert für eine Kontrolltransfektion mit SuperFect (ohne Avidin, biotinyliertes SuperFect) lag bei 0,9 Units/ml.

Für 250 ng und 500 ng Antikörper wurde mittels X-Gal-Staining der Prozentsatz
25 an transfizierten Zellen bestimmt; er lag bei 4,8 % (250 ng) bzw. 5,0 % (500 ng) der Zellen. Dieses Ergebnis ließ sich in weiteren Experimenten bestätigen.

Ansprüche

1. Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und verzweigtem kationischen Polymer, wobei das verzweigte kationische Polymer die Eigenschaft hat, mit Nukleinsäuren Komplexe zu bilden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Anteil des verzweigten kationischen Polymers biotinyliert ist.
2. Zusammensetzung, enthaltend einen Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer, dadurch gekennzeichnet, daß ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil der Dendrimermoleküle, die biotinyliert sind, an der Gesamtmenge der Dendrimermoleküle 0,01 bis 100 % (Mol/Mol) beträgt.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil der Dendrimermoleküle, die biotinyliert sind, an der Gesamtmenge der Dendrimermoleküle 0,5 bis 50 % (Mol/Mol) beträgt.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil der Dendrimermoleküle, die biotinyliert sind, an der Gesamtmenge der Dendrimermoleküle 5 bis 20 % (Mol/Mol) beträgt.
6. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, herstellbar durch ein Verfahren mit den Schritten
 - (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge aktivierten Biotins oder eines aktivierten Biotinderivats oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin oder aktivierten Biotinderivats, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin kommt;
 - (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24;

(c) Inkubation der unter (b) entstandenen Mischung mit Nukleinsäure unter Bedingungen, unter denen sich ein Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer bilden kann.

- 5 7. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex zusätzlich Avidin oder Streptavidin sowie ein biotinyliertes zielspezifisches Bindungsmolekül enthält.
8. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Bindungsmolekül ein Zelloberflächenmolekül erkennt.
- 10 8. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Bindungsmolekül ein Zelloberflächenmolekül erkennt.
9. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Bindungsmolekül Transferrin oder ein Antikörper ist.
- 15 9. Zusammensetzung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Bindungsmolekül Transferrin oder ein Antikörper ist.
10. Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen in vitro oder in vivo mit den Schritten
- 20 (a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist;
- (b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten zielspezifischen Bindungsmolekül;
- 25 (c) Inkubation des in Schritt (b) entstandenen Komplexes mit Zellen.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Zellkultur in Suspension wachsen.
- 30 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Blutzellen oder Blutzelllinien sind.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen B- oder T-Zellen oder davon abgeleitete Zelllinien sind.

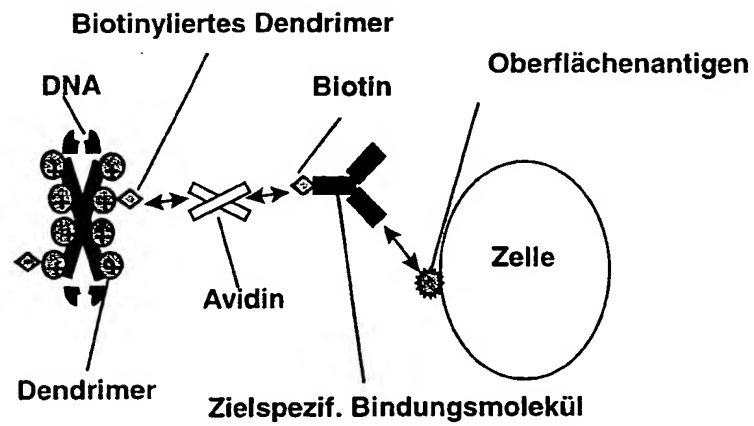
14. Reagenzienkit zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen, mindestens enthaltend
- (a) Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist; und
- 5 (b) Avidin oder Streptavidin.
15. Reagenzienkit nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich ein biotinyliertes zielspezifisches Bindungsmolekül und/oder eine Nukleinsäure enthält.
- 10 16. Verwendung eines Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 11 oder 12 zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen.
17. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in
- 15 Zellkultur in Suspension wachsen.
18. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, mit den Schritten
- (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge aktivierten Biotins
- 20 oder eines aktivierten Biotinderivats oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin oder aktiviertem Biotinderivat, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin kommt;
- 25 (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24;
- (c) Inkubation der unter (b) entstandenen Mischung mit Nukleinsäure unter Bedingungen, unter denen sich ein Komplex aus Nukleinsäure und Dendrimer
- 30 bilden kann.
19. Verfahren zur Herstellung eines Dendrimers, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, mit den Schritten
- (a) Umsetzung von Dendrimer mit einer äquimolaren Menge aktivierten Biotins

- oder eines aktivierten Biotinderivats oder einem molaren Überschuß an aktiviertem Biotin oder aktiviertem Biotinderivat, vorzugsweise einem 2- bis 64fachen molaren Überschuß, besonders bevorzugt einem 2- bis 12fachen molaren Überschuß unter Bedingungen, bei denen es zur kovalenten Verknüpfung zwischen Dendrimer und Biotin kommt;
- 5 (b) Mischen des unter (a) gebildeten biotinylierten Dendrimers mit nicht-biotinyliertem Dendrimer, vorzugsweise in einem Massenverhältnis von 1:1 bis 1:256, besonders bevorzugt in einem Massenverhältnis von 1:4 bis 1:24.
- 10 20. Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist, herstellbar nach einem Verfahren gemäß Anspruch 19.
21. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder ein Dendrimer nach Anspruch 20 sowie
- 15 gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
22. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder einem Dendrimer nach Anspruch 20 in der Gentherapie.
- 20 23. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder einem Dendrimer nach Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Gentherapie.
24. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder
- 25 einem Dendrimer nach Anspruch 20 in einem Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen in vivo mit den Schritten
- (a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist;
- 30 (b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten Ziel-spezifischen Bindungsmolekül;
- (c) Verabreichung des in Schritt (b) entstandenen Komplexes in einen tieri-

schen Organismus, gegebenenfalls in Verbindung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.

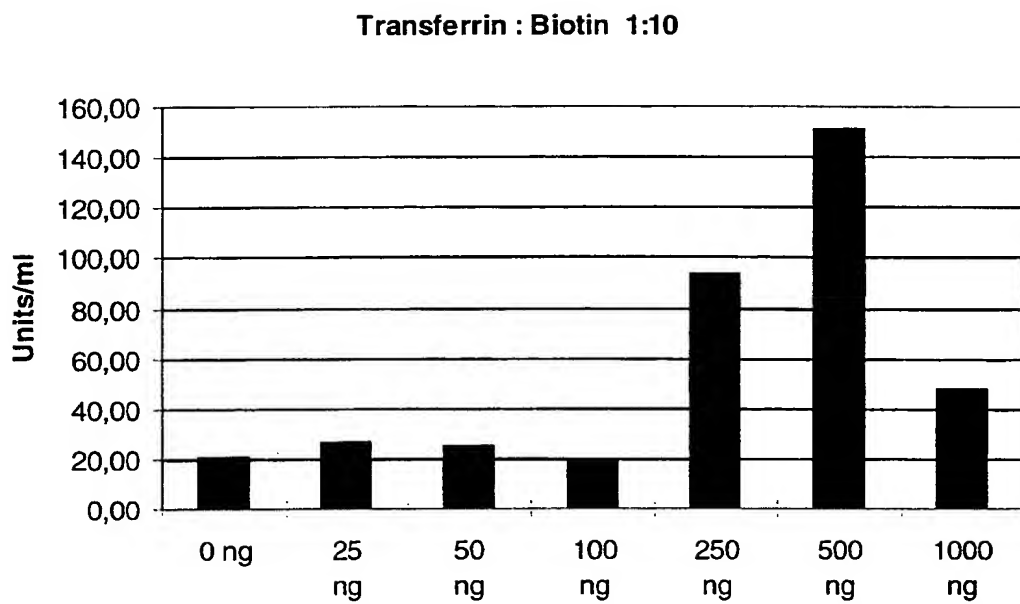
1/11

Abbildung 1



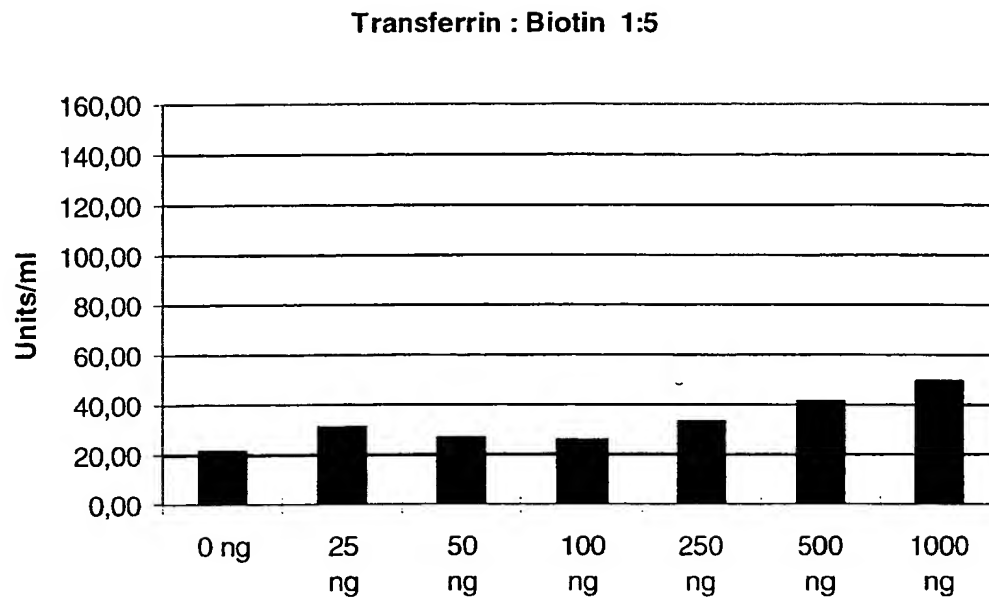
2/11

Abbildung 2



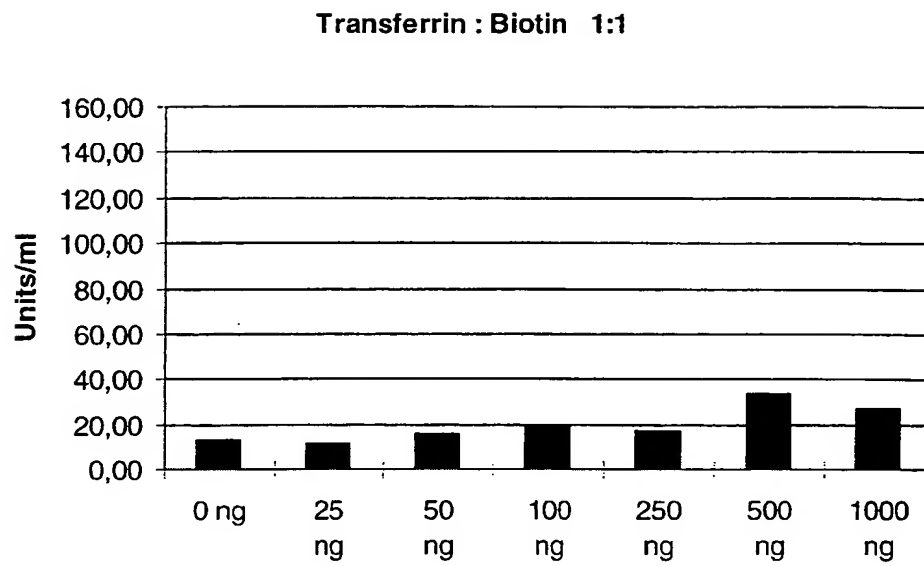
3/11

Abbildung 3



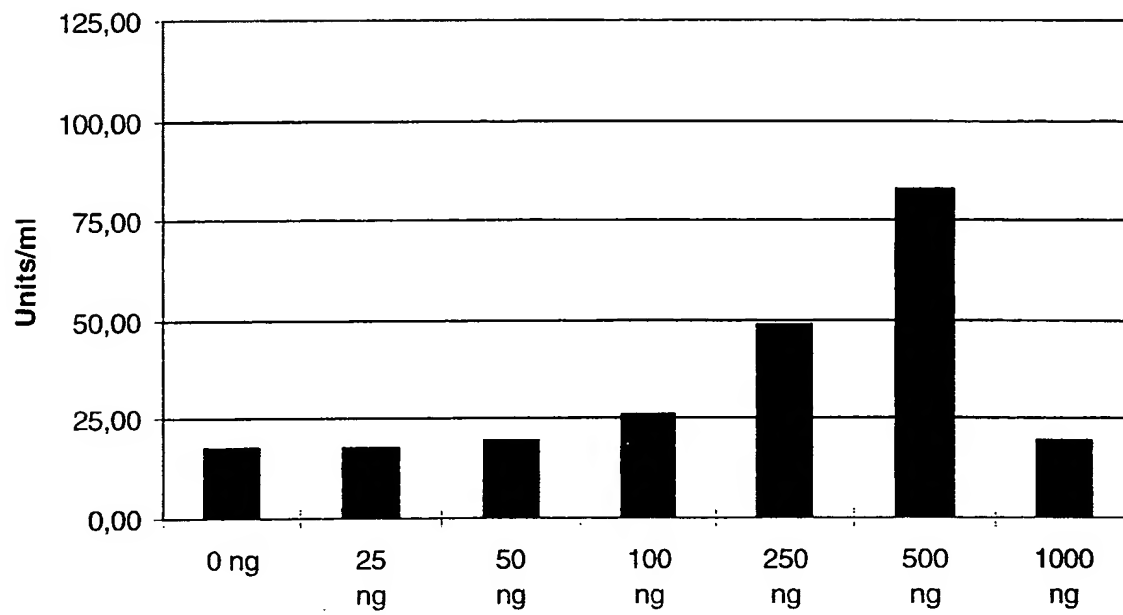
4/11

Abbildung 4



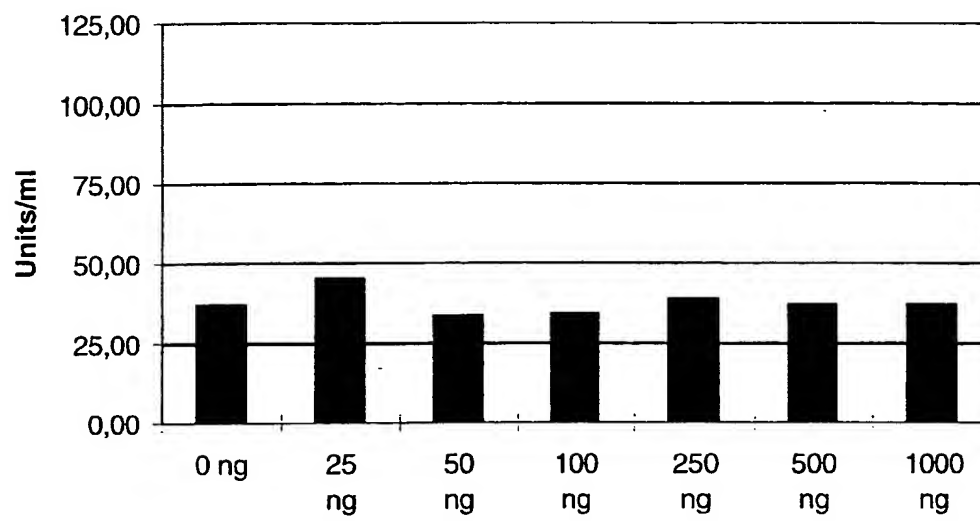
5/11

Abbildung 5



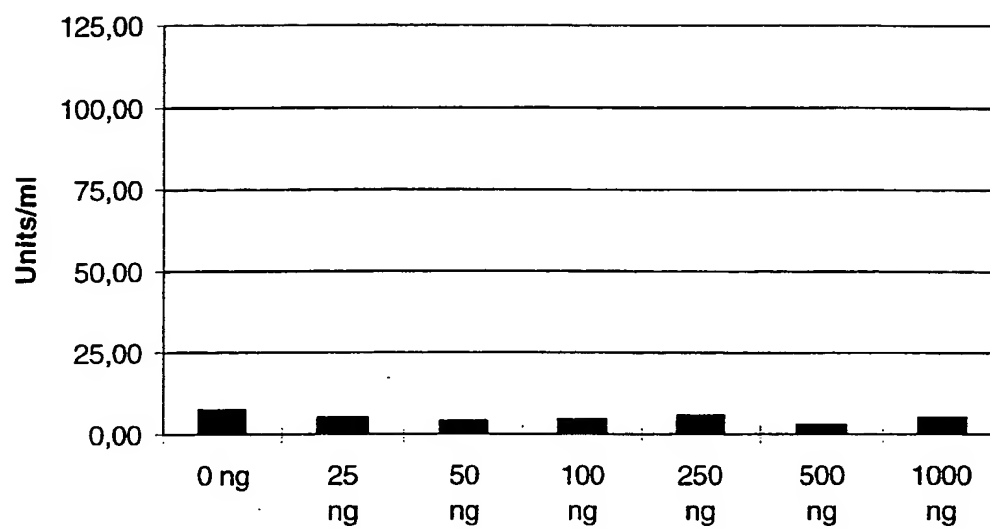
6/11

Abbildung 6



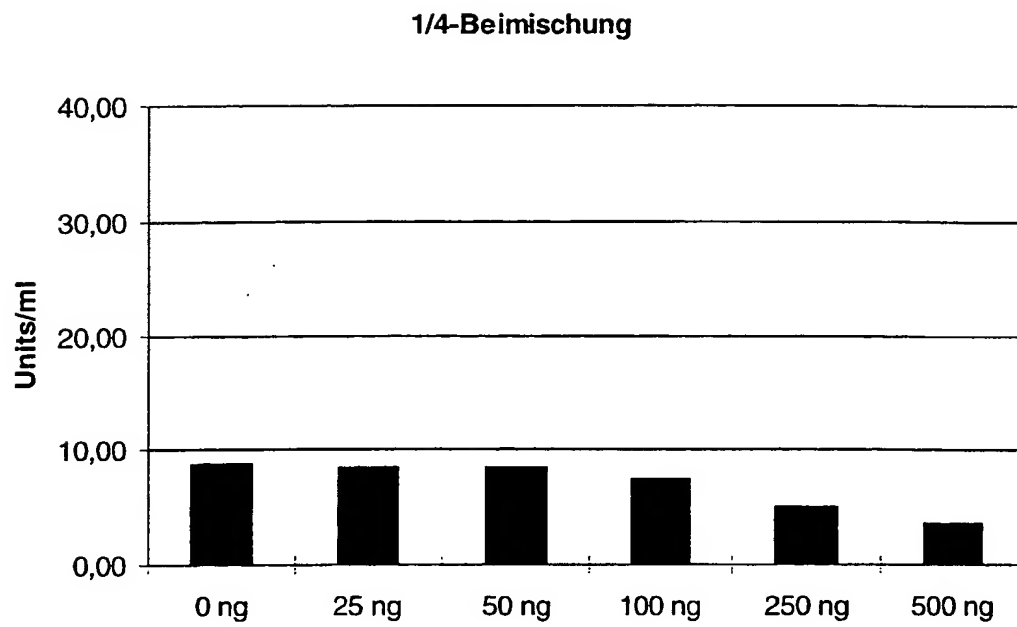
7/11

Abbildung 7



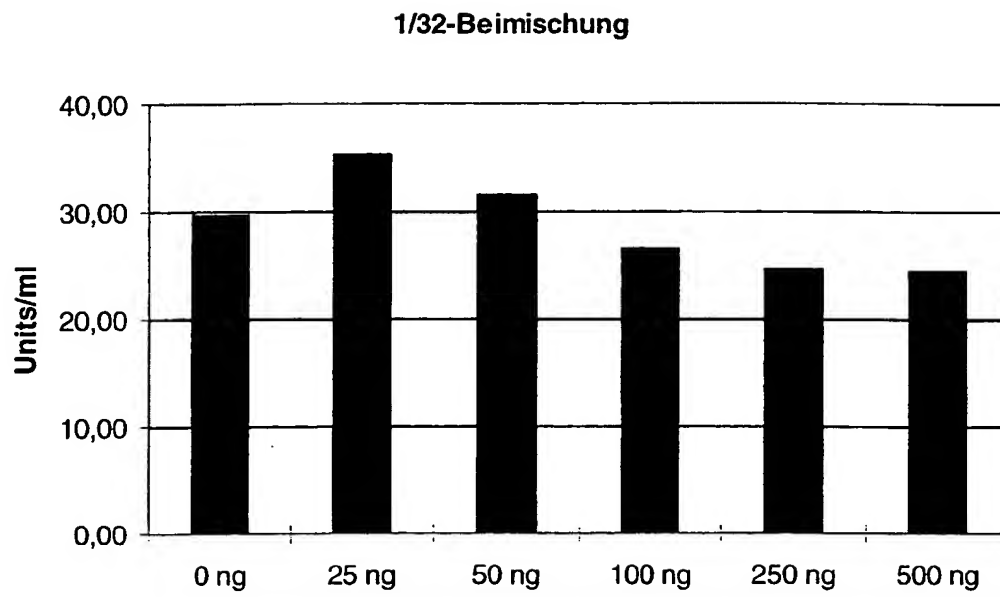
8/11

Abbildung 8



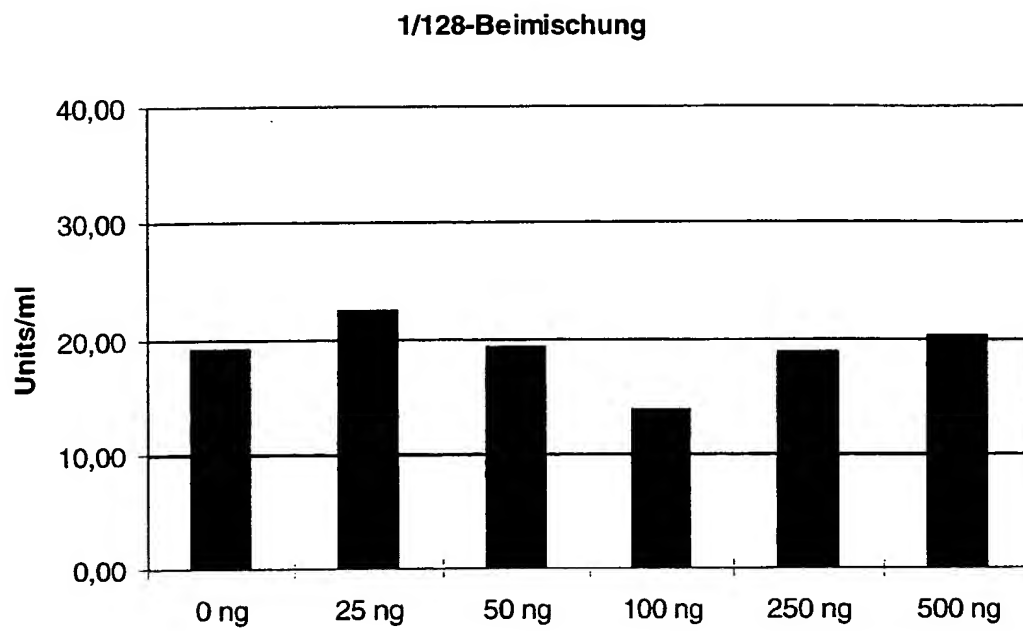
9/11

Abbildung 9



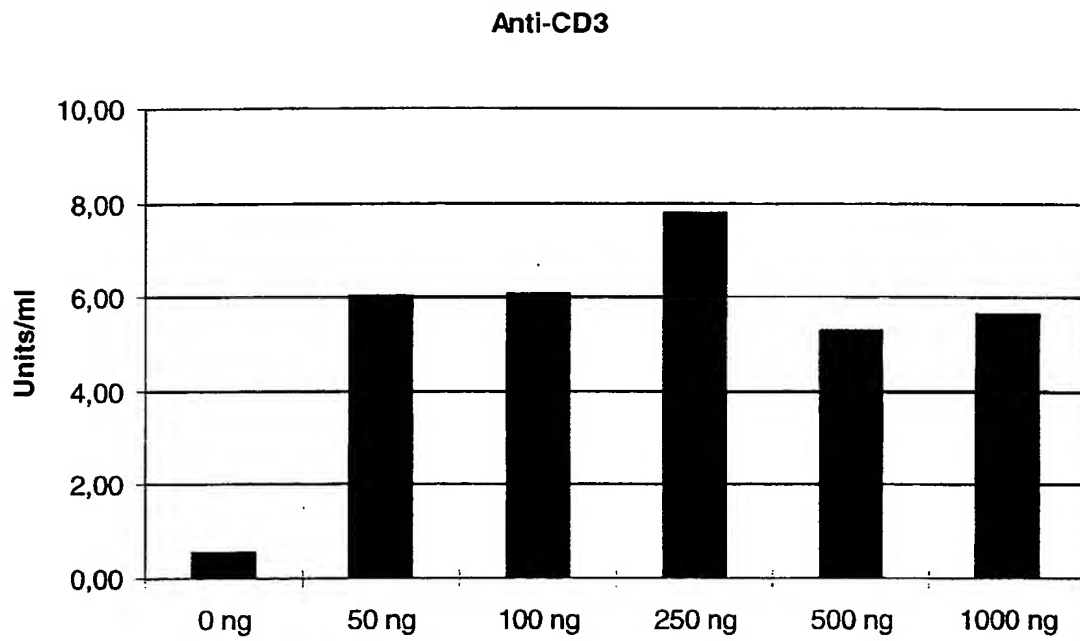
10/11

Abbildung 10



11/11

Abbildung 11



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/76633 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48. (DE). ERBACHER, Christoph [DE/DE]; Hülsberg 8.
C12N 15/87 42781 Haan (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03746 (74) Anwalt: WACHENFELD, Joachim; Vossius & Partner.
Siebertstr. 4. 81675 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 3. April 2001 (03.04.2001) (81) Bestimmungsstaat (national): US.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT.
BE. CH. CY. DE. DK. ES. FI. FR. GB. GR. IE. IT. LU. MC.
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch NL. PT. SE. TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 100 16 881.7 5. April 2000 (05.04.2000) DE Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Str.
4, 40724 Hilden (DE). (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 14. Februar 2002
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEBER, Martin Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
[DE/DE]; Fliederweg 26. 42799 Leichlingen (DE). DEN- Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
NIG, Jörg [DE/DE]; Richrath Str. 173, 40723 Hilden Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TARGETED TRANSFECTION OF CELLS USING A BIOTINYLATED DENDRIMER

(54) Bezeichnung: GEZIELTE TRANSFEKTION VON ZELLEN MITTELS BIOTINYLIERTEM DENDRIMER

(57) Abstract: The invention relates to a method for carrying out the targeted transfection of cells, to compositions, which can be used for such methods, and to corresponding medicaments for use in gene therapy. The invention particularly relates to a method for introducing nucleic acid into cells involving the following steps: (a) mixing a nucleic acid with a dendrimer, whereby a portion of the dendrimer molecules is biotinylated; mixing the prepared complex, which consists of a nucleic acid and a dendrimer, with a second complex, which consists of an avidin or a streptavidin and of a biotinylated target-specific binding molecule, and; (c) incubating the complex prepared in step (b) with cells. Dendrimers that are well-suited for the invention are, for example, partially solvolyzed polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. Target-specific binding molecules are, in particular, cell type-specific markers also of the cell surface of the target cells.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten Transfektion von Zellen, Zusammensetzungen, die für solche Verfahren verwendet werden können, sowie entsprechende Arzneimittel für die Gentherapie. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einbringen von Nukleinsäure in Zellen mit den Schritten: (a) Mischen einer Nukleinsäure mit einem Dendrimer, wobei ein Anteil der Dendrimermoleküle biotinyliert ist; (b) Mischen des entstandenen Komplexes aus Nukleinsäure und Dendrimer mit einem zweiten Komplex, bestehend aus Avidin oder Streptavidin und einem biotinylierten zielspezifischen Bindungsmolekül; und (c) Inkubation des in Schritt (b) entstandenen Komplexes mit Zellen. Für die vorliegende Erfindung gut geeignete Dendrimere sind beispielsweise partiell solvolysierte Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere. Zielspezifische Bindungsmoleküle sind insbesondere zelltypspezifische Marker auch der Zelloberfläche der Zielzellen.

WO 01/76633 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 02397 A (UNIV CALIFORNIA) 26 January 1995 (26.01.95) cited in the application see the whole document, particularly Claim 1 in combination with Claim 45 and pages 23 and 24, particularly line 45 on page 24	1-24
X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 93 19768 A (UNIV CALIFORNIA) 14 October 1993 (14.10.93) see the whole document, particularly page 18, line 33 and 34</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Δ document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 October 2001

Date of mailing of the international search report

10/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

G. Willière

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/03746

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TANG M X ET AL: "IN VITRO GENE DELIVERY BY DEGRADED POLYAMIDOAMINE DENDRIMERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 7, no. 6, 1 November 1996 (1996-11-01), pages 703-714, XP000638685 ISSN: 1043-1802 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/03746

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9502397	A	26-01-1995	AU 681735 B2	04-09-1997
			AU 1240095 A	13-02-1995
			CA 2163364 A1	26-01-1995
			EP 0708637 A1	01-05-1996
			JP 9500136 T	07-01-1997
			WO 9502397 A1	26-01-1995
			US 6113946 A	05-09-2000
			US 5661025 A	26-08-1997
			US 5972600 A	26-10-1999
			US 5990089 A	23-11-1999
<hr/>				
WO 9319768	A	14-10-1993	AU 682308 B2	02-10-1997
			AU 4027893 A	08-11-1993
			CA 2133323 A1	14-10-1993
			EP 0636028 A1	01-02-1995
			JP 7505639 T	22-06-1995
			WO 9319768 A1	14-10-1993
			US 6113946 A	05-09-2000
			US 5955365 A	21-09-1999
			US 5977084 A	02-11-1999
			US 5661025 A	26-08-1997
			US 5972600 A	26-10-1999
			US 5990089 A	23-11-1999
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03746

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K47/48 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 02397 A (UNIV CALIFORNIA) 26. Januar 1995 (1995-01-26) in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument, insbesondere Anspruch 1 in Kombination mit Anspruch 45 und Seiten 23 und 24, insbesondere Zeile 45 auf Seite 24 ---	1-24
X	WO 93 19768 A (UNIV CALIFORNIA) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) siehe das ganze Dokument, insbesondere Seite 18, Zeilen 33 und 34 ---	1-24
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Oktober 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/10/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

G. Willière

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03746

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TANG M X ET AL: "IN VITRO GENE DELIVERY BY DEGRADED POLYAMIDOAMINE DENDRIMERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 7, Nr. 6, 1. November 1996 (1996-11-01), Seiten 703-714, XP000638685 ISSN: 1043-1802 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----</p>	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03746

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9502397	A	26-01-1995	AU 681735 B2 04-09-1997
			AU 1240095 A 13-02-1995
			CA 2163364 A1 26-01-1995
			EP 0708637 A1 01-05-1996
			JP 9500136 T 07-01-1997
			WO 9502397 A1 26-01-1995
			US 6113946 A 05-09-2000
			US 5661025 A 26-08-1997
			US 5972600 A 26-10-1999
			US 5990089 A 23-11-1999
WO 9319768	A	14-10-1993	AU 682308 B2 02-10-1997
			AU 4027893 A 08-11-1993
			CA 2133323 A1 14-10-1993
			EP 0636028 A1 01-02-1995
			JP 7505639 T 22-06-1995
			WO 9319768 A1 14-10-1993
			US 6113946 A 05-09-2000
			US 5955365 A 21-09-1999
			US 5977084 A 02-11-1999
			US 5661025 A 26-08-1997
			US 5972600 A 26-10-1999
			US 5990089 A 23-11-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.